



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

| APPLICATION NO. | FILING DATE | FIRST NAMED INVENTOR | ATTORNEY DOCKET NO. | CONFIRMATION NO. |
|-----------------|-------------|----------------------|---------------------|------------------|
| 09/590,884 | 06/09/2000 | Erika Hawkins | 341.014US1 | 1643 |

21186 7590 05/09/2003

SCHWEGMAN, LUNDBERG, WOESSNER & KLUTH, P.A.
P.O. BOX 2938
MINNEAPOLIS, MN 55402

EXAMINER

GITOMER, RALPH J

| ART UNIT | PAPER NUMBER |
|----------|--------------|
|----------|--------------|

1651

DATE MAILED: 05/09/2003

16

Please find below and/or attached an Office communication concerning this application or proceeding.



**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office**

Address: COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS
Washington, D.C. 20231

| | | | |
|-----------------|-------------|----------------------|---------------------|
| APPLICATION NO. | FILING DATE | FIRST NAMED INVENTOR | ATTORNEY DOCKET NO. |
|-----------------|-------------|----------------------|---------------------|

EXAMINER

ART UNIT

PAPER NUMBER

DATE MAILED:

Please find below and/or attached an Office communication concerning this application or proceeding.

Commissioner of Patents and Trademark

SEE ATTACHED TRANSLATION

MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

| | |
|--|---|
| (19)【発行国】 日本国特許庁 (J P) | (19)[ISSUINGCOUNTRY] Japanese Patent Office (JP) |
| (12)【公報種別】 公開特許公報 (A) | Laid-open (Kokai) patent application number (A) |
| (11)【公開番号】 特開平 7 - 6 7 6 9 6 | (11)[UNEXAMINEDPATENTNUMBER] Unexamined-Japanese-Patent 7-67696 |
| (43)【公開日】 平成 7 年 (1 9 9 5) 3 月 1 4 日 | (43)[DATEOFFIRSTPUBLICATION] March 14th, Heisei 7 (1995) |
| (54)【発明の名称】 バックグラウンド発光の低減法 | (54)[TITLE] Reduction method of background luminescence |
| (51)【国際特許分類第 6 版】 C12Q 1/28 6807- 4B G01N 21/76 | (51)[IPC] C12Q 1/28 6807-4B G01N21/76 |
| 【審査請求】 未請求 | [EXAMINATIONREQUEST] UNREQUESTED |
| 【請求項の数】 1 | [NUMBEROFCLAIMS] One |
| 【出願形態】 O L | [Application form] OL |
| 【全頁数】 6 | [NUMBEROFPAGES] Six |
| (21)【出願番号】 特願平 5 - 2 2 1 0 1 8 | (21)[APPLICATIONNUMBER] Japanese Patent Application No. 5-221018 |
| (22)【出願日】 平成 5 年 (1 9 9 3) 9 月 6 日 | (22)[DATEOFFILING] September 6th, Heisei 5 (1993) |
| (71)【出願人】 | (71)[PATENTEE/ASSIGNEE] |
| 【識別番号】 | [IDCODE] |

0 0 0 0 0 3 3 0 0

000003300

【氏名又は名称】

東ソー株式会社

Tosoh Corp.

【住所又は居所】

山口県新南陽市開成町 4 5 6 0
番地

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 三苦 惠民

Yoshitami Mitoma

【住所又は居所】

神奈川県藤沢市湘南台 4 丁目 2
6 番 5 - 1 0 6 号

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 熊倉 幸子

Sachiko Kumakura

【住所又は居所】

神奈川県厚木市緑ヶ丘 3 丁目 2
- 2 - 3 0 2

[ADDRESS]

(57) 【要約】

(57)[SUMMARY]

【目的】

2, 3 - ジヒドロ - 1, 4 - フ
タラジオン誘導体及び酸化剤を
用いて酸化触媒であるヘム又は
ペルオキダーゼをそれらの触媒
作用による発光反応に基づいて
測定する場合の、バックグラン
ド発光の低減法の提供。

[OBJECT]

To provide the reduction method of background
luminescence in the case of measuring heme or
peroxidase which is an oxidation catalyst,
based on luminous reaction by their catalytic
actions using a 2,3- dihydro- 1,4-
phtalazinedione derivative and an oxidizing
agent.

【構成】

特定の化学式で示される官能基
又はその塩を構造中に含み、且
つ水酸基を有する芳香族炭化水

[SUMMARY OF THE INVENTION]

A measurement is carried out in the presence of
1 or more kinds of compounds which contain a
functional group shown in a specific chemical
formula or its salt, do not contain an aromatic

素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上の共存下で測定を実施することにより、ヘム又はペルオキシダーゼの測定におけるバックグラウンド発光を低減する。

hydrocarbon which has a hydroxyl group, and have a chelate action, thereby reducing the background luminescence in a measurement of a heme or peroxidase.

【特許請求の範囲】

[CLAIMS]

【請求項1】

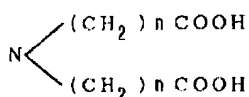
2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオン誘導体を酸化剤存在下、ヘム又はペルオキシダーゼで処理することで生じる発光を、以下の化式1~4（但しXはH、OH、COOH、n=1~3）で示される官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上の共存下で測定することを特徴とする、ヘム又はペルオキシダーゼの測定におけるバックグラウンド発光の低減法。

[CLAIM 1]

A reduction method of background luminescence in a measurement of a heme or peroxidase characterized in that light-emission produced by processing a 2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione derivative with heme or peroxidase in the presence of an oxidizing-agent is measured in the presence of 1 or more compounds which contain a functional group or its salt shown in the following chemical formulas 1-4 (X is H, OH, COOH, n=1-3), and do not contain an aromatic hydrocarbon with a hydroxyl group, and have a chelate action.

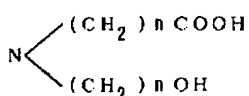
【化1】

[COMPOUND 1]



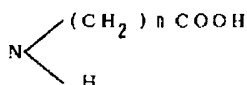
【化2】

[COMPOUND 2]



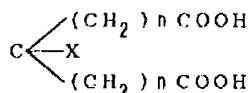
【化 3】

[COMPOUND 3]



【化 4】

[COMPOUND 4]



【発明の詳細な説明】

[DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION]

【 0 0 0 1 】

[0001]

【産業上の利用分野】

本発明は、2，3－ジヒドロ－1，4－フタラジオン誘導体及び酸化剤を用いて、酸化触媒であるヘム又はペルオキダーゼをそれらの触媒作用による発光反応に基づいて測定する場合の、バックグラウンド発光の低減法に関するものである。

[INDUSTRIAL APPLICATION]

This invention relates to the reduction method of background luminescence in the case of measuring the heme or peroxidase which is an oxidation catalyst, based on the luminous reaction by their catalytic actions using a 2,3-dihydro- 1,4- phthalazinedione derivative and an oxidizing agent.

【 0 0 0 2 】

[0002]

【従来の技術】

生体中の極微量物質の定量には、近年酵素免疫測定法（EIA）が用いられるようになってきたが、標識酵素の測定には蛍

[PRIOR ART]

The enzyme immunoassay (EIA) has come to be used for a fixed quantity of the ultralow-volume substance in a living body in recent years.

However, it is in power to use a fluorescent

光基質を用いることが主流となっている。しかし蛍光物質の測定では、励起光の影響等で必ずしも高感度測定が容易ではなく、より高感度な測定が可能な発光基質を用いた酵素免疫測定法 (CLEIA) が提案されている。

【0003】

CLEIAに用いられる酵素として、アルカリフォスファターゼやペルオキシダーゼ等が挙げられるが、アルカリフォスファターゼに使用される発光基質の場合、ジオキセタン構造を含む発光基質のリン酸基を加水分解する事により不安定化し、分解する際に発光するように設計されている。

【0004】

ペルオキシダーゼの場合、単独でルミノールを過酸化水素等の酸化剤と反応させると、酵素の絶対量として数フェントモル程度までは短時間の発光が認められるが、それ以下の量になるとバックグラウンド発光に隠されてしまい、測定が難しい。この問題に対しThorpe等は、フェノール誘導体やヒドロキシベンゾチアゾール等の化合物 (エンハンサー) を上記の系に添加する事により発光が著しく増強し、且つ発光が長時間持続する事を報告している (Methods in Enzymology 133, p331-353, 1986 年)。これら一連のエンハンサーは、酸化剤とルミノールを混合した際に発生するバックグラウンド発光を低下させると同

substrate for a measurement of a marker enzyme.

However in a measurement of a fluorescent material, a high sensitive measurement is not necessarily easy under the influence of excitation light etc. The enzyme immunoassay (CLEIA) using the light-emission substrate which can perform a higher-sensitivity measurement is proposed.

[0003]

An alkali phosphatase, peroxidase, etc. are mentioned as an enzyme used for CLEIA.

However, in the case of the light-emission substrate used to an alkali phosphatase, a destabilization is carried out by hydrolyzing the phosphoric-acid group of the light-emission substrate containing dioxatane structure.

When decomposing, it designs so that a light emission.

[0004]

When making a luminol react with oxidizing agents, such as a hydrogen peroxide, independently in the case of peroxidase, short-time light-emission will observe to the several femtomol level as an amount of absolute of an enzyme.

However, when becoming the quantity not more than it, it will be hidden in background luminescence, and a measurement is hard.

Thorpe etc. has reported that light-emission augments remarkably and light-emission continues for a long time by adding compounds (enhancer), such as a phenol derivative and a hydroxy benzothiazole, to the type of the above with respect to this problem. (Methods in Enzymology 133, p 331-353, 1986).

The enhancer of these series has the effect which augments the light-emission by catalyst of peroxidase etc., while making background luminescence generated when having mixed the oxidizing agent and the luminol reduce.

Thereby, peroxidase can be measured now to about several 10 atto mol.

時に、ペルオキシダーゼ等の触媒による発光をを増強する効果があり、これによりペルオキシダーゼは数10アトモル程度まで測定できるようになっている。ペルオキシダーゼを標識に使ったCLEIAにおいては、この増強反応を利用して従来より高感度に種々の測定項目が定量できるようになった。

In CLEIA using peroxidase as a label, A fixed quantity of various measurement items came be conventionally completed high-sensitivity using this augmentation reaction.

【0005】

[0005]

【発明が解決しようとする課題】

前述のようなアルカリフォスファターゼ測定に使用される発光基質の場合、アルカリフォスファターゼの至適pHにおいて、これら発光基質の磷酸エステルのは酵素的な加水分解が起こりやすく、これに由来するバックグランド発光が生じやすいという課題がある。バックグランド発光が生じると、微量のアルカリフォスファターゼに由来する微小な発光がバックグランドと区別できないため、測定感度を高めることができないのである。

[PROBLEM ADDRESSED]

In the case of the light-emission substrate used to the above alkali phosphatase measurements, In the optimum pH of an alkali phosphatase

The hydrolysis like a non-enzyme of the phosphoric ester of these light-emission substrate ease to occur, and the subject that it is easy to produce the background luminescence originating in this occurs.

Since the micro light-emission originating in a trace amount alkali phosphatase cannot distinguish with a back ground when background luminescence arises, a measurement sensitivity cannot be increased.

【0006】

またペルオキシダーゼ測定に使用される発光基質やエンハンサーについても、微量のペルオキシダーゼを測定しようとする場合には前記アルカリフォスファターゼの場合と同様の課題がある。例えばエンハンサーを添加しても、依然バックグランド発光が高いレベルにあるため、その

[0006]

About the light-emission substrate and the enhancer which are also used to a peroxidase measurement When it is going to measure trace amount peroxidase, the subject similar to the case of the above-mentioned alkali phosphatase occurs.

Since a high level has as always background luminescence even if it adds an example enhancer, the light-emission less than the level is because it cannot catch.

レベル以下の発光はとらえる事が出来ないためである。

【0007】

このように、この高いバックグラウンド発光を低く抑える方法の開発が高感度測定を達成するためには不可欠であった。

[0007]

Thus, it was essential in order for development of the method of controlling low this high background luminescence to achieve a high sensitive measurement.

【0008】

【課題を解決するための手段】
本発明者等は、ルミノール、酸化剤及びエンハンサーからなる系におけるバックグラウンド発光の低減法について鋭意研究した結果、本発明を完成した。すなわち本発明は、2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオン誘導体を酸化剤存在下、ヘム又はペルオキシダーゼで処理することで生じる発光を、以下の化式5~8（但しXはH、OH、COOH、n=1~3）で示される官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上の共存下で測定することを特徴とする、ヘム又はペルオキシダーゼの測定におけるバックグラウンド発光の低減法である。以下本発明を詳細に説明する。

[0008]**[SOLUTION OF THE INVENTION]**

These inventors did earnestly research about the reduction method of background luminescence in the type consisting of a luminol, an oxidizing agent, and an enhancer.

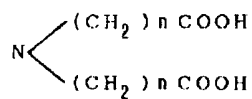
As a result, this invention was completed.

That is, this invention, Light-emission which produces a 2,3- dihydro- 1,4- phthalazinedione derivative by processing by the heme or peroxidase in an oxidizing-agent presence, It measures by being under 1 or more kinds of coexistence of the compound which has a chelate action which contains in structure the functional group or the its salt shown by the following chemical formula 5-8 (however X is H, OH, COOH, n= 1-3), and does not contain in structure the aromatic hydrocarbon which has a hydroxyl group.

It is the reduction method of background luminescence in a measurement of the heme or peroxidase characterized by the above-mentioned.

This invention is explained in detail below.

【0009】**[0009]****【化5】****[COMPOUND 5]**

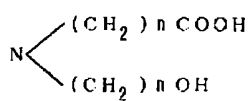


【0010】

[0010]

【化6】

[COMPOUND 6]

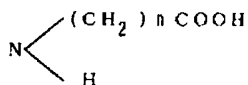


【0011】

[0011]

【化7】

[COMPOUND 7]

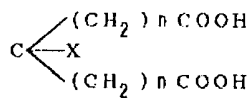


【0012】

[0012]

【化8】

[COMPOUND 8]



【0013】

[0013]

ルミノールに代表される2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジ

When mixing the oxidizing agents represented by the luminol, such as a 2,3- dihydro- 1,4-

オン誘導体と過酸化水素等の酸化剤を弱アルカリ性の溶液中で混合すると、ヘムやペルオキシダーゼといった酸化触媒を添加しなくとも、あるレベルの発光が認められる。これが本発明でいうバックグランド発光である。このバックグランド発光は、反応系内に微量に存在する金属イオンに起因するものであることが確認された。従って本発明は、前記4種類の官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上を共存させることによりバックグランド発光を低減するものである。

【0014】

このような性質を持つ化合物としては、例えば、trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid monohydrate 及びその塩、N,N-Bis(2hydroxyethyl)glycine 及びその塩、1,3-Diamino-2-hydroxypropane-N,N,N',N'-tetraacetic acid 及びその塩、Diethylenetriamine-N,N,N',N'',N''-pentaacetic acid 及びその塩、Ethylenediamine-N,N'-diacetic acid 及びその塩、Ethylenediamine-N,N'-dipropionic acid, dihydrochloride 及びその塩、N-(2-Hydroxyethyl)ethylenediamine-N,N',N'-triacetic acid 及びその塩、O,O'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid 及びその塩、1,6-

phthalazinedione derivative and a hydrogen peroxide, in a weakly alkaline solution, even if it will not add an oxidation catalyst said a heme and peroxidase, light-emission of a certain level observes.

This is background luminescence said by this invention.

It was confirmed that this background luminescence is a thing resulting from the metal ion which exists trace amount in a reaction system.

Therefore this invention reduces background luminescence by making 1 or more kinds of a compound which have a chelate action which contains in structure the 4 above-mentioned kinds of functional groups, or an its salt, and does not contain in structure the aromatic hydrocarbon which has a hydroxyl group coexist.

[0014]

As a compound with such a property For example, trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid monohydrate, And an its salt, N, N-Bis(2hydroxyethyl) glycine, And an its salt, 1,3-Diamino-2-hydroxypropane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, And its salt, Diethylenetriamine-N, N,N',N'',N''-pentaacetic acid, and an its salt, Ethylenediamine-N, N'-diacetic acid, And an its salt, Ethylenediamine-N, N'-dipropionic acid and dihydrochloride, And an its salt, N-(2-Hydroxyethyl) ethylenediamine-N,N',N'-triacetic acid, And an its salt, O, O'-Bis(2-aminoethyl) ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid, And an its salt, 1,6-Hexamethylethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid, And an its salt, N-(2-Hydroxyethyl) iminodiacetic acid, And an its salt, Iminodiacetic acid and an its salt, 1,2-Diaminopropane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, And an its salt, Nitrilotriacetic acid and an its salt, Nitrilotripropionic acid and an its salt, Triethylenetetramine-N,N,N',N'',N''',N'''-hexaacetic acid, And an its salt, N-(2-

Hexamethylethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid 及びその塩、N-(2-Hydroxyethyl)iminodiacetic acid 及びその塩、Iminodiacetic acid 及びその塩、1,2-Diaminopropane-N,N,N',N'-tetraacetic acid 及びその塩、Nitrilotriacetic acid 及びその塩、Nitrilotripropionic acid 及びその塩、Triethylenetetramine-N,N,N',N'',N''',N''''-hexaacetic acid 及びその塩、N-(2-acetoamido)iminodiacetic acid 及びその塩、O,O'-Bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-teraacetic acid 及びその塩、クエン酸及びその塩等が例示できる。

acetoamido) iminodiacetic acid, And an its salt, O, O'-Bis(2-aminophenyl) ethyleneglycol-N, N, N', N'-teraacetic acid, And an its salt, a citric acid, an its salt, etc. can be illustrated.

【0015】

系内に添加する化合物の濃度としては、0.01mM から 5mM、好ましくは0.05mMから1.0mMが良い。これ以上の濃度で使用する場合、ヘムやペルオキシダーゼ等の触媒活性に由来する発光を阻害する場合があるため、実施に先立ち、予備的実験を行い、添加濃度条件を決定しておく和良好的。

【0015】

As concentration of the compound added in the system, they are 5 mM from 0.01 mM. Preferably, 0.05 mM to 1.0 mM are good.

Since the light-emission originating in catalytic activity, such as a heme and peroxidase, may be inhibited when using by the concentration beyond this, it is good to perform preliminary experiment to implementation prior to that, and to determine addition concentration conditions.

【0016】

前記のような官能基を有する化合物であっても、Ethylenediaminehydroxyphenylacetic acid 及びその塩のように水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含むキレート剤は、ヘムやペルオキシダーゼ等の触媒活性に由来する発光を阻害する場合がある。

【0016】

Even if it is the compound which has the above functional groups, the chelating agent which contains in structure the aromatic hydrocarbon which has a hydroxyl group like Ethylenediaminehydroxyphenylacetic acid and an its salt may inhibit the light-emission originating in catalytic activity, such as a heme and peroxidase.

【0017】

本発明で用いられる 2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオン誘導体として、例えばルミノール及びその誘導体、イソルミノール及びその誘導体、7-Dimethylaminonaphthalene-1,2-dicarboxylic acid hydrazide 等が例示できる。酸化剤としては、例えば、過酸化水素、過ほう酸ソーダ等が例示できる。

【0018】

バックグラウンド発光のみを低減する目的ではエンハンサーを加える必要がないが、バックグラウンド発光がより低い事が望ましい状況、即ち極低濃度のヘム又はペルオキシダーゼの測定を行う場合、エンハンサーを併用すると効果的である。エンハンサーは、例えば p 位置置換フェノール誘導体 (p ヨードフェノール、4-フェニルフェノール他)、2-ヒドロキシケイヒ酸、ホタルルシフェリン及びその誘導体、6-ヒドロキシベンゾチアゾール、4-(4-ヒドロキシフェニル)チアゾール等を例示できる。

【0019】

本発明は、種々の起源のペルオキシダーゼについて適用可能であるが、特に西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼに好適である。西洋ワサビペルオキシダーゼのアイソマーの中では、特に塩基性アイソマーに好適であり、この時の pH としては弱アルカリ性、pH8.0 から pH9.5 が良く、緩衝液としてはトリスヒ

[0017]

As the 2,3- dihydro- 1,4- phthalazinedione derivative used by this invention, for example, a luminol and an its derivative, an iso luminol and an its derivative, and 7-Dimethylaminonaphthalene-1,2-dicarboxylic acid hydrazide etc. can be illustrated.

As an oxidizing agent, for example, a hydrogen peroxide, the perboric-acid soda, etc. can be illustrated.

[0018]

An enhancer does not need to be added for the objective which reduces only background luminescence.

However, when the thing with lower background luminescence performs a measurement of a preferable situation, that is, the heme of ultra-low concentration or peroxidase, it is effective when using an enhancer together.

An enhancer can illustrate p position substituted phenol derivative (p iodo phenol, 4-phenylphenol, et al.), 2-hydroxy cinnamic acid, firefly luciferin and an its derivative, 6- hydroxy benzothiazole, 4- (4- hydroxyphenyl) thiazole, etc., for example.

[0019]

Although this invention is applicable about peroxidase of the various origins, it is suitable for in particular peroxidase derived from a horseradish.

In particular in the isomer of a Western horseradish peroxidase, it is suitable for the basic isomer.

As pH at this time, alkalescent pH8.0 to pH9.5 is good, and an amine type or boric-acid types, such as tris hydroxy methane, etc. are preferable as buffer.

ドロキシメタン等のアミン系又はほう酸系等が好ましい。

【0020】

[0020]

【発明の効果】

本発明によれば、系内のバックグラウンド発光を低減し得、しかも酸化触媒に由来する発光は阻害することのない、即ちバックグラウンド発光のみを特異的に低減したヘム又はペルオキシダーゼの測定が可能である。本発明を用いればバックグラウンド発光が従来に比べて低く抑えられるため、従来バックグラウンド発光に埋もれていたヘム又はペルオキシダーゼによるシグナル発光を高感度に測定できる。また本発明は、ペルオキシダーゼ等を抗体の標識物として使用した、増強発光エンザイムイムノアッセイ（Enhanced-CLEIA）に応用することが可能である。この場合、単にペルオキシダーゼ等の測定にとどまらず、種々の生体微量物質の高感度測定に応用できる。

[EFFECT OF THE INVENTION]

According to this invention, background luminescence of an inside system can be reduced, and light-emission which moreover originates in an oxidation catalyst is not inhibited, that is, can perform a measurement of a heme or peroxidase which reduced only background luminescence specifically.

Since background luminescence can be low suppressed as compared with the prior art if this invention is used, the signal light-emission by the heme or peroxidase conventionally buried in background luminescence can be measured high-sensitivity.

Moreover this invention can be applied to the augmentation light-emission enzyme immunoassay (Enhanced-CLEIA) which used peroxidase etc. as a label object of an antibody.

In this case, it does not only remain in a measurement of peroxidase etc., but it can apply to a high sensitive measurement of various living-body trace amount substances.

【0021】

[0021]

【実施例】

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は実施例のみに限定されるものではない。

[Example]

Hereafter, an Example is shown and this invention is more specifically explained.

However, this invention is not limited only to an Example.

【0022】

[0022]

実施例 1

0.2mM 4-フェニルフェノー

Example 1

0.2 mM 4-phenylphenol, 1.0 mM hydrogen

ル、1.0mM 過酸化水素、0.5mM ルミノール Na 塩及び 0.1mM の表 1 に示した化合物を含む 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 溶液を調製し、バックグランド発光(カウント/分)を測定した。比較のため、4-フェニルフェノール、過酸化水素、ルミノール Na 塩以外は含まない 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 溶液を調製し、同様にバックグランド発光を測定した。発光測定は市販の測定装置 (アロカ社製 BLR-301) を使用し、それぞれ 200 μ l の試料について、試薬調製後 30 秒から 1 分間の発光量を積算した。結果を表 1 に示す。なお表 1 において、CyDTA は Trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, monohydrate を、DHEG は N,N-Bis(2hydroxyethyl)glycine を、EDDA は Ethylenediamine-N,N'-diacetic acid を、EDTA は Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid を、EGTA は O,O'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid を、IDA は Iminodiacetic acid を、NTA は Nitrilotriacetic acid を、Arg. はアルギニン、Asp. はアスパラギン酸を、Cys. はシスチンを、Glu.A はグルタミン酸を、His. はヒスチジンを、Orn. はオルニチンを、Tyr. はチロシンを、2,3DCPyri. は 2,3-Dicarboxypyridine を、NM2,3DCPyri. は 1-2,3-dicarboxypyridine を、

peroxide, 0.5 mM luminol Na salt, and 0.1M tris hydrochloric-acid buffer (pH8.5) solution containing the compound shown to Table 1 of 0.1 mM are prepared.

Background luminescence (a part for count/) was measured.

For the comparison, 4- phenylphenol, a hydrogen peroxide, and 0.1M tris hydrochloric-acid buffer (pH8.5) solution not contained except a luminol Na salt were prepared, and background luminescence was measured similarly.

The light-emission measurement used the commercially available measuring device (アロカ company BLR-301), and each integrated the amount of light-emission of 1 minute from 30 seconds after reagent preparation about the 200-micro-l sample.

A result is shown to Table 1.

In addition in Table 1,

CyDTA shows Trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid and monohydrate. DHEG shows N, N-Bis(2hydroxyethyl) glycine and EDDA shows Ethylenediamine-N,N'-diacetic acid. EDTA shows Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid. EGTA shows O, O'-Bis(2-aminoethyl) ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid. IDA shows Iminodiacetic acid. NTA shows Nitrilotriacetic acid. Arg. shows arginine. Asp. shows aspartic acid. Cys. shows cystine. Glu.A shows glutamic acid. His. shows histidine. Orn. shows ornithine. Tyr. shows a tyrosine. 2 and 3DCPyri. show 2,3-Dicarboxypyridine. NM2 and 3DCPyri. show 1-2,3-dicarboxypyridine. 2 and 3DCPyra show 2,3-Dicarboxypyridine.

CyDTA, DHEG, EDDA, EDTA, EGTA, IDA, and NTA satisfy the property as a compound of this invention among these compounds. That is, it is the compound which has a chelate action which contains in structure an above-mentioned functional group or an above-mentioned its salt, and does not contain in structure the aromatic hydrocarbon which has a hydroxyl group.

2,3DCPyra は 2,3-Dicarboxypyridine をそれぞれ示す。これら化合物のうち、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA、NTA は本発明の化合物としての性質を満たすもの、すなわち前述の官能基又はその塩を構造中に含み且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まないキレート作用を有する化合物である。

【0023】

表1からは、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA 又は NTA を添加した場合に、無添加又はその他を添加した場合と比較して明らかにバックグラウンド発光が低減されていることがわかる。

[0023]

Table 1 finds that background luminescence is clearly reduced compared with the case where non-addition or others is added, when CyDTA, DHEG, EDDA, EDTA, EGTA, IDA, or NTA is added.

【0024】

[0024]

【表1】

[Table 1]

| 試薬名 | バックグラウンド発光量 (counts/min.) | 試薬名 | バックグラウンド発光量 (counts/min.) |
|-------|------------------------------|--------------|------------------------------|
| 無添加 | 1,820 | Cys. | 1,295 |
| CyDTA | 197 | Glu.A | 1,544 |
| DHEG | 346 | His. | 1,535 |
| EDDA | 649 | Orn. | 1,889 |
| EDTA | 799 | Tyr. | 1,071 |
| EGTA | 272 | アントラニル酸 | 1,422 |
| IDA | 465 | 2,3DCPyri. | 11,784 |
| NTA | 205 | NM2,3DCPyri. | 3,317 |
| Arg. | 1,713 | 2,3DCPyra. | 2,734 |
| Asp. | 1,361 | | |

Row: reagent name, background luminescence

Column: reagent name: no addition, anthranilic acid

【0025】

実施例 2

実施例 1 においてバックグラウンド発光の低減が認められた化合物、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA 又は NTA について、これら化合物がペルオキシダーゼの触媒作用を妨害しないか否か試験した。

【0026】

0.2mM 4-フェニルフェノール、1.0mM 過酸化水素、0.5mM ルミノール Na 塩及び 0.1mM の表 2 に示した化合物を含む 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 溶液を調製し、250 アトモル (10 μ l) の西洋ワサビペルオキシダーゼ溶液を添加した。添加後 30 秒から 1 分間の発光を実施例 1 と同様に測定した。結果を表 2 に示す。表 2 から、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA 又は NTA がバックグラウンド発光の低減効果を有し、しかもペルオキシダーゼの酸化作用を妨害しないことがわかる。

【0027】**【表 2】****[0025]**

Example 2

It examined whether these compounds would not disturb the catalytic action of peroxidase about the compound with which the reduction of background luminescence observed in Example 1, CyDTA, DHEG, EDDA, EDTA, EGTA and IDA, or NTA.

[0026]

0.2 mM 4-phenylphenol, 1.0 mM hydrogen peroxide, 0.5 mM luminol Na salt, and 0.1M tris hydrochloric-acid buffer (pH8.5) solution containing the compound shown to Table 2 of 0.1 mM are prepared.

The Western horseradish-peroxidase solution of a 250atto mole (10 micro-l) was added.

Light-emission of 30 seconds to 1 minute was measured like Example 1 after adding.

A result is shown to Table 2.

Table 2 finds that cyDTA, DHEG, EDDA, EDTA, EGTA, IDA, or NTA has the reduction effect of background luminescence, and what the oxidation of peroxidase moreover is not disturbed.

[0027]**[Table 2]**

| 試薬名 | バックグラウンド発光 (counts/min.) | ホルミジン添加時の 発光量 (Counts/min.) | S/N比 |
|-------|-----------------------------|--------------------------------|--------|
| 無添加 | 1,820 | 253,363 | 139.2 |
| CyTDA | 197 | 250,771 | 1272.9 |
| DHEG | 346 | 215,528 | 623.6 |
| EDDA | 649 | 239,032 | 368.3 |
| EDTA | 799 | 252,844 | 316.5 |
| EGTA | 272 | 231,688 | 851.8 |
| IDA | 465 | 249,905 | 537.4 |
| NTA | 205 | 240,664 | 173.9 |

Row: reagent name, background luminescence, luminescence with addition of peroxidase, S/N ratio

Column: reagent name: no addition

【0028】

実施例3

表3に示した化合物を 0.1mM 又は 1mM 濃度で使用した以外は実施例1と同様の操作を行い、バックグラウンド低減効果を調査した。結果を表3に示す。なお表3において ADA は N-(2-acetoamido)iminodiacetic acid を、DS は Dextran Sulfatesodium を、MOPS は 3-(N-Morpholino)Propane-sulfonic Acid を、2,2Bipy は 2,2Bipyridy を、o-Phn は o-Phenanthrolin をそれぞれ示す。なお、表3において、ADA 又はクエン酸は本発明の化合物としての性質を満たすものすなわち前述の官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まないキレート作用を有する化合物である。

【0029】

表3からは、ADA、クエン酸又は DS を添加した場合に、無添

【0028】

Example 3

Except having used the compound shown to Table 3 by 0.1 mM or 1 mM concentration, the operation similar to Example 1 was performed and the back-ground reduction effect was investigated.

A result is shown to Table 3.

In addition it sets to Table 3, ADA shows N-(2-acetoamido) iminodiacetic acid. DS shows DextranSulfatesodium. MOPS shows 3-(N-Morpholino) Propane-sulfonic Acid. 2, 2Bipy show 2 and 2Bipyridy. (omicron) -P hn shows -P(omicron) henanthrolin.

In addition, in Table 3,

ADA or a citric acid satisfies the property as a compound of this invention. That is, it is the compound which has a chelate action which contains in structure an above-mentioned functional group or an above-mentioned its salt, and does not contain in structure the aromatic hydrocarbon which has a hydroxyl group.

【0029】

Table 3 finds that background luminescence is clearly reduced compared with the case where non-addition or others is added, when ADA, a

加又はその他を添加した場合と citric acid, or DS is added.
 比較して明らかにバックグラ
 ド発光が低減されていることが
 わかる。

【0030】

[0030]

【表 3】

[Table 3]

| 試薬名 | バックグラウンド発光量 (Counts/min) | 試薬名 | バックグラウンド発光量 (Counts/min) |
|-----------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|
| 無添加 | 3,524 | クエン酸 0.1mM | 250 |
| コハク酸0.1mM | 3,978 | 1.0mM | 79 |
| 1.0mM | 4,375 | 酒石酸 0.1mM | 4,600 |
| シュウ酸0.1mM | 4,040 | 1.0mM | 1,821 |
| 1.0mM | 1,071 | MOPS 0.1mM | 9,908 |
| ADA 0.1mM | 569 | 1.0mM | 33,763 |
| 1.0mM | 364 | 2,2Bipy. 0.1mM | 9,174 |
| DS 0.1mM | 508 | o-Phn. 0.1mM | 10,207 |

Row: reagent name, background luminescence

Column: reagent name: no addition, succinic acid, oxalic acid, citric acid, tartaric acid

【0031】

[0031]

実施例 4

Example 4

実施例 3 において使用した
 ADA、DS 及びクエン酸につい
 て、これら化合物が実際にペル
 オキシダーゼの触媒作用を妨害
 しないか否か試験した。

About ADA, DS and the citric acid which were
 used in Example 3, it examined whether these
 compounds would not actually disturb the
 catalytic action of peroxidase.

【0032】

[0032]

0.2mM 4-フェニルフェノール、
 1.0mM 過酸化水素、0.5mM
 ルミノール Na 塩及び 0.1mM
 の表 4 に示した化合物を含む
 0.1M トリス塩酸緩衝液
 (pH8.5) 溶液を調製し、250

A 0.2 mM 4-phenylphenol, 1.0 mM hydrogen
 peroxide, a 0.5 mM luminol Na salt, and 0.1M
 tris hydrochloric-acid buffer (pH8.5) solution
 containing the compound shown to Table 4 of
 0.1 mM are prepared.

The Western horseradish-peroxidase solution
 of a 250atto mole (10 micro-I) is added.

アトモル (10 μ l) の西洋ワサビペルオキシダーゼ溶液を添加し、添加後 30 秒から 1 分間の発光を実施例 1 と同様に測定した。結果を表 4 に示す。

Light-emission of 30 seconds to 1 minute was measured like Example 1 after adding.

A result is shown to Table 4.

【0033】

表 4 から、本発明の化合物である ADA 及びクエン酸はバックグランド発光の低減効果を有し、かつペルオキシダーゼの酸化作用を妨害しないことがわかるが、DS ではバックグランド発光の低減効果が認められるもののペルオキシダーゼの酸化作用をも妨害していることがわかる。

[0033]

Table 4 finds that ADA and the citric acid which are the compound of this invention have the reduction effect of background luminescence, and do not disturb the oxidation of peroxidase.

However, in DS, although the reduction effect of background luminescence observes, it finds that the oxidation of peroxidase is also disturbed.

【0034】

[0034]

【表 4】

[Table 4]

| 薬名 | バックグランド発光量 (Counts/min) | ペルオキシダーゼ添加時の 発光量 (Counts/min.) | S/N 比 |
|------------|----------------------------|-----------------------------------|--------|
| 無添加 | 3,524 | 253,363 | 71.9 |
| ADA 0.1mM | 569 | 171,911 | 302.1 |
| 1.0mM | 364 | 115,223 | 316.5 |
| DS 0.1mM | 508 | 4,860 | 9.6 |
| クエン酸 0.1mM | 250 | 211,125 | 844.5 |
| 1.0mM | 79 | 189,262 | 2395.7 |

Row: reagent name, background luminescence, luminescence with addition of peroxidase, S/N ratio

Column: reagent name: no addition, citric acid

【0035】

実施例 5

甲状腺刺激ホルモン (TSH) に対するモノクローナル抗体をペプシン消化して F (a b)' 2 化

[0035]

Example 5

After carrying out pepsin digestion of the monoclonal antibody with respect to a thyrotropic hormone (TSH) and forming it into

した後、ゲルろ過及び疎水クロマトグラフにより精製し、ジチオスレイトールにより還元して Fab 化した。Fab 化フラグメントはゲルろ過により精製し、これに SMCC (Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) で修飾した西洋ワサビペルオキシダーゼを加え 37°C で 1 時間反応させた後、ゲルろ過により酵素標識抗体 (コンジュゲート) 画分を分取した。

【0036】

分取したコンジュゲートは UV280nm の吸収を測定した後、4 °C にて保存した。反応容器に抗 TSH F (ab)² 化抗体を固相化した磁性ビーズ (φ = 1.4mm) 12 個を入れ、これに TSH ゼロ血清又は既知濃度 (4.81 μIU/ml) 血清 100 μl を加え、37°C 5 分間攪拌しながら反応させた後、B/F 分離を行い、0.1M NaCl、50mM トリス緩衝液、0.5 % Tween 20 (pH8.5) を含む溶液で洗浄し、先に調製したコンジュゲート (希釈液にて 200 倍希釈したもの) 100 μl 加え、更に 37°C 10 分間反応させた。次いで B/F 分離後洗浄を 5 回行った後、発光検出器 (アロカ社製 BLR-301) にセットし、0.2mM 4-Phenylphenol、1.0mM 過酸化水素、0.5mM ルミノール Na 塩、0.1mM CyDTA、0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) を含む発光試薬 200 μl を加え、添加後 30 秒から 1 分間の発光量を実施例 1 と同様にして積算した。な

F(ab)², the gel filtration and a hydrophobic chromatograph refine.

It reduced by the dithiothreitol and it Fab-ized. The gel filtration refines Fab-ized fragment.

The Western horseradish peroxidase modified by SMCC (Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate) is added to this. After carrying out 1 hour reaction by 37 degrees-Celsius, the enzyme label antibody (conjugate) fraction was aliquoted by the gel filtration.

[0036]

After the aliquoted conjugate measured absorption of UV280 nm, it was preserved by 4 degrees-Celsius.

12 piece of the magnetic beads (φ) (=1.4 mm) which carried out solidified the anti-TSHF(ab)²-ized antibody is put into the reaction container.

TSH zero serum or 100 micro-l of known concentration (4.81 micro-IU/ml) serums are added to this. After making it react, stirring 5 minutes of 37 degrees-Celsiuses, B / F separation is performed. It washes with 0.1MNaCl, 50 mM tris buffers, and the solution which contains Tween20 (pH8.5) 0.5%.

Conjugate (thing was diluted 200 times by dilution liquid) 100 micro-l prepared previously is added. Furthermore it was made to react 10 minutes of 37 degrees-Celsiuses.

Subsequently it sets to the light-emission detector (Aloka Co., Ltd., BLR-301), after performing B / washing after F separation 5 times. 0.2 mM4-Phenylphenol, 1.0 mM hydrogen peroxide, a 0.5 mM luminol Na salt, 0.1 mMCyDTA, and 200 micro-l of the light-emission reagents containing 0.1M tris hydrochloric-acid buffer (pH8.5) are added. The amount of light-emission of 30 seconds to 1 minute was integrated like Example 1 after adding.

In addition the measurement was performed by a unit of 5 times about the same test liquid.

お測定は、同一の被検液について 5 回ずつ行った。測定結果（平均値、標準偏差、変動値、2SD法による検出下限界濃度を表 5 に示す。

Measurement result (the detection minimum field concentration by the mean value, the standard deviation, the variation, and 2SD method is shown to Table 5)

【0037】

表 5 から CyDTA 添加系の S/N 比（陽性血清での発光量／ゼロ血清の発光量）は 851 であるのに対し、CyDTA 非添加系での S/N 比は 147 であり、S/N 比的に約 6 倍改善されたことがわかる。また CyDTA を添加した場合の検出下限界濃度は 0.004 であるのに対し、これを添加しなかった場合では 0.017 であり、検出下限界濃度も約 6 倍改善されたことがわかる。

[0037]

S/N ratio (the amount of light-emission of the amount of light-emission / zero serum in a positive serum) of Table 5 to CyDTA addition type is 851. S/N ratio of CyDTA the non-adding type with respect to it is 147.

It improves about 6 times in S/N ratio, and an octopus is found.

Moreover the detection minimum field concentration at the time of adding CyDTA is 0.004. It is 0.017 when this is not added with respect to it.

Detection minimum field concentration also finds to have improved about 6 times.

【0038】

[0038]

【表 5】

[Table 5]

| | 発光量 (counts/min) | | | |
|-------------------------|------------------|-----------|--------------|--------------|
| | CyDTA添加 | CyDTA無添加 | CyDTA添加 | CyDTA無添加 |
| TSH濃度 (μ IU/ml) | 陰性血清 0 | 陰性血清 0 | 陽性血清 48.1 | 陽性血清 48.1 |
| 平均値 | 131 | 789 | 111,458 | 116,279 |
| 標準偏差 | 47 | 201 | 7,697 | 6,312 |
| 変動値(%) | 36 | 25 | 7 | 5 |
| 検出下限界濃度 | - | - | 0.004 | 0.017 |

Row: luminescence

Column: TSH concentration, mean value, standard deviation, variation, detection minimum field concentration; luminescence: CyDTA addition, negative serum; CyDTA non-addition; positive serum



DERWENT TERMS AND CONDITIONS

Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)